

## تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های بروسلا ملی تنسیس جدا شده از خون بیماران با روش MIC

دکتر هادی پیری دوگاهه<sup>۱</sup>، مرضیه علی قلی<sup>۲</sup>، دکتر محمد حسین دهقان<sup>۳</sup>، دکتر پرویز مالک نژاد<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup>استادیار میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل E-mail: h.peeridogaheh@arums.ac.ir

<sup>۲</sup>مربی میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران <sup>۳</sup> دانشیار بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل <sup>۴</sup> استاد میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

### چکیده

**زمینه و هدف:** بروسلاز یکی از شایعترین بیماری های مشترک بین انسان و دام است و بروسلاز انسانی در تمام نقاط ایران آندمیک می باشد. تعداد بیماران ثبت شده در سال ۱۹۸۸، هفتاد یک هزار و ۵۱ نفر (۱۳۲/۴ در هر صد هزار نفر) بود. بدلیل اینکه گونه های بروسلا باکتری های درون سلولی اختیاری می باشند تعداد محدودی آنتی بیوتیک بر این ارگانیسم ها موثر می باشند. مطالعه حاضر با هدف بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی ۴۷ سویه بروسلا ملی تنسیس جدا شده از نمونه های بالینی انجام شده است.

**روش کار:** حساسیت آنتی بیوتیکی ۴۷ سویه بروسلا ملی تنسیس جدا شده از نمونه های بالینی در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. حداقل غلظت مهاري MIC (Minimal Inhibitory Concentration) مواد ضد میکروبی مورد آزمایش توسط روش ترقیق آگار دایلوژن (Agar Dilution) اندازه گیری شد. مقادیر MIC<sub>50</sub> و MIC<sub>90</sub> حداقل غلظت، آنتی بیوتیک در نظر گرفته شد که در آن غلظت به ترتیب رشد ۹۰٪ و ۵۰٪ سویه ها مهار گردید. جهت تفسیر نتایج از معیارهای (NCCLS) National Committee for Clinical Laboratory Standards برای باکتری های کند رشد استفاده شد.

**یافته ها:** تتراسیکلین (MIC<sub>50</sub>: 0.13، میکروگرم/ میلی لیتر ۰/۲۵ MIC<sub>90</sub>) و استرپتومایسین (MIC<sub>50</sub>: ۰/۰۰۳، میکروگرم/ میلی لیتر ۰/۲۵ MIC<sub>90</sub>) حداقل غلظت مهاري را در آزمایشگاه بر علیه سویه های بروسلا ملی تنسیس داشتند. نور فلوکساسین بیشترین مقدار MIC<sub>90</sub> را نشان داد (۸ میکروگرم/ میلی لیتر). حساسیت بیش از نیمی از سویه های بروسلا نسبت به ریفامپین کاهش یافته بود. (مقدار حداقل غلظت مهاري ۲ میکروگرم/ میلی لیتر)

**نتیجه گیری:** سویه های بروسلا در آزمایشگاه نسبت به اکثر آنتی بیوتیک هایی که در درمان بروسلاز به کار میروند حساس می باشند. در ایران برای آنتی بیوتیک هایی که بر علیه گونه های بروسلا به کار می روند مقاومت قابل ملاحظه ای مشاهده نگردید، با وجود این، از آنجائیکه ریفامپین برای درمان بیماری های شایعی چون سل بطور وسیع مورد استفاده قرار میگیرد، باید الگوی حساسیت منطقه ای ریفامپین بصورت دوره ای مورد بررسی قرار گیرد

**واژه های کلیدی:** روش آگار دایلوژن، حساسیت آنتی بیوتیکی، بروسلا ملی تنسیس، حداقل غلظت مهاري

پذیرش: ۸۶/۱۰/۳۰

دریافت: ۸۵/۱۱/۱۱

### مقدمه

بروسلاز یکی از شایعترین بیماری های مشترک بین انسان و دام با انتشار جهانی است و بروسلا ملی تنسیس شایعترین عامل ایجاد بیماری می باشد. تنها ۱۷ کشور در دنیا به عنوان کشورهای عاری از بروسلاز شناخته

شده اند در حالی که طی سال های اخیر شیوع بیماری در سراسر جهان رو به افزایش می باشد [۱]. بروسلاز در بسیاری از نقاط جهان آندمیک بوده و در کشورهای در حال توسعه از شیوع بالایی برخوردار است. در ایران بروسلاز انسانی در تمام نقاط کشور آندمیک است و

تعداد بیماران با تشخیص قطعی در سال ۱۹۸۸، هفتاد و یک هزار و پنجاه و یک نفر بودند، که یکی از بالاترین مقادیر شیوع در جهان می باشد [۲]. بر اساس اطلاعاتی که مرکز مدیریت بیماری های عفونی منتشر کرده است، وضعیت ایران در مورد بیماری بروسلوز در حال بهتر شدن است. در سال ۱۹۸۹ موارد بروز سالانه بروسلوز بیش از ۱۰۰۰ مورد در هر یک میلیون نفر بود، در حالیکه در سال ۲۰۰۳، موارد بروز سالانه به ۲۳۸/۶ کاهش یافت. با وجود این هنوز بروسلوز انسانی بار سنگینی را بر جامعه تحمیل می کند [۳].

سازمان بهداشت جهانی (WHO)<sup>۱</sup> تعداد موارد جدید بیماری بروسلوز را در هر سال ۵۰۰ هزار مورد گزارش نموده است و این مقدار بسیار کمتر از میزان واقعی محاسبه شده بروز بروسلوز انسانی می باشد [۴]. بروسلوز بیماری است با تظاهرات گوناگون که تمام بافت ها و اندام های مختلف انسان را تحت تأثیر قرار می دهد [۵، ۴].

علائم بالینی فوق العاده غیراختصاصی است و تظاهرات بسیار متغیری را نشان می دهد. تظاهرات بیماری به صورت یک سندرم تب دار همراه با علائم سیستمیک شامل لرز، تعریق، سردرد، کمردرد، بی اشتها و کاهش وزن بوده و یا به صورت گرفتاری هایی مانند آرتریت، اسپوندیلیت، آندوکاردیت، مننژیت، اپیدیدیمواریکیت و غیره بروز می کند [۵]. درمان بروسلوز با آنتی بیوتیک باعث کاهش علائم، کاهش درد و همچنین کاهش عود بیماری و سایر عوارض ثانویه بروسلوز می شود. به دلیل تمرکز بروسلاها در داخل سلول های میزبان استفاده از داروهایی که قدرت نفوذ به داخل سلول ها را دارند ضروری به نظر می رسد. در درمان بروسلوز برای جلوگیری از بروز مقاومت از ترکیب دو دارو استفاده می شود. درمان معمول بروسلوز ترکیبی از تتراسیکلین خوراکی به همراه استرپتومایسین تزریقی و یا ترکیب ریفامپین خوراکی و تتراسیکلین خوراکی است. به جای استرپتومایسین از جنتامایسین هم استفاده می شود [۶].

هر یک از این رژیم های دارویی مضراتی را به همراه دارد. استرپتومایسین باید به صورت تزریقی عضلانی به مدت ۲ تا ۳ هفته تجویز شود. اما تزریق های مکرر برای بیمار آزار دهنده است تجویز استرپتومایسین و تتراسیکلین در خانم های حامله و تتراسیکلین در کودکان کمتر از ۸ سال به دلیل تأثیر بر دندان ها، مجاز نیست. این ترکیب های دارویی نتایج خوبی دارند [۷-۱۱] و نسبت عود در ترکیب درمان ۳۰ روزه استرپتومایسین و تتراسیکلین بین ۸/۴-۰ درصد بوده و در ترکیب تتراسیکلین و ریفامپین با دوره درمان بر ۳۸/۸٪ و دوره درمانی ۶ هفته ای تتراسیکلین و استرپتومایسین برابر ۱۳/۴-۰ درصد است [۱۲].

علاوه بر معایب رژیم های دارویی که در بالا ذکر شد، در زنان حامله ای که ریفامپین به تنهایی تجویز می شود عود بیماری نسبتاً بالاست، که خود ممکن است باعث بروز سویه های مقاوم گردد [۱۴، ۱۳].

در ایران نیز هیچ آمار و ارقام دقیق و قابل استفاده در مورد الگوی مقاومت و حساسیت بروسلا نسبت به آنتی بیوتیک های رایج در دسترس نمی باشد. این فقدان اطلاعات موجب درمان نامناسب همراه با صرف هزینه های نابجا برای بیماران است. وجود گزارش های منتشر شده از بعضی نقاط دنیا مبنی بر مقاومت بروسلا نسبت به برخی داروها مانند ریفامپین و تری متوپریم / سولفامتوکسازول و یافتن ژن مقاومت نسبت به ریفامپین [۱۵-۱۸] و نبودن آمار درست، نیاز به مطالعه ای دقیق احساس می شود. آگاهی از الگوی مقاومت این باکتری موجب استفاده از داروهای مناسب در بیماران مبتلا می گردد که از میزان هزینه های اقتصادی درمان نیز خواهد کاست. ضمن این که نتایج و یافته های این طرح در پروتکل درمانی بروسلوز مورد استفاده قرار خواهد گرفت. مطالعه حاضر با هدف بررسی کارآیی تاثیر مواد ضد میکروبی مختلف بر علیه سویه های بروسلا ملی تنسیس جدا شده از کشت خون انجام شده است.

<sup>1</sup> World Health Organization

## روش کار

در این مطالعه که برای تعیین MIC<sup>۱</sup> آنتی‌بیوتیک‌های رایج در درمان بروسلوز انجام شد، از ۵۰ سویه بروسلا که از بیماران مبتلا به بروسلوز توسط گروه میکروپزشناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران جدا شده بود، استفاده گردید. مطالعه حاضر از نوع توصیفی-تحلیلی می‌باشد. روش نمونه‌گیری از نوع آسان و زمان انجام مطالعه در یک دوره یکساله (دی ماه ۸۴ تا دی ماه ۸۵) می‌باشد و برای آنالیز نتایج از روش‌های آمار توصیفی استفاده شد. باکتری‌ها در محیط تریپتیکیس سوی‌برات (TSB)<sup>۲</sup> کشت داده شده بودند که پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته در ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد به آن گلیسرول اضافه و در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند.

## تعیین MIC:

جهت تعیین MIC از روش رقت در آگار (agar dilution) و بر اساس استاندارد (NCCLS)<sup>۳</sup> استفاده شد.

## آماده‌سازی باکتری‌ها:

قبل از انجام آزمایش MIC، باکتری‌ها را از فریزر خارج کرده و دو بار بر روی محیط آگار خون کشت داده و در مجاورت ۱۰-۵ درصد CO<sub>2</sub> گرمخانه‌گذاری شد. پس از حصول اطمینان از خالص بودن کشت باکتری‌ها از آنها جهت تعیین MIC استفاده شد. از ۵۰ سویه‌ای که کشت مجدد داده شده بود ۳ سویه از دست رفته و آزمایش‌ها بر روی ۴۷ سویه انجام شد.

## مراحل انجام تعیین MIC نسبت به استرپتومایسین

## تهیه محلول ذخیره آنتی‌بیوتیک:

پودر استرپتومایسین از کارخانه زیگماتیه گردید و چون طبق برگه آنالیز حلال و رقیق‌کننده این آنتی‌بیوتیک آب مقطر است پس از محاسبه و توزین پودر آب مقطر استریل به آن اضافه و پس از استریل

کردن به روش فیلتراسیون در شیشه‌های درپچ‌دار اضافه و در فریزر ۲۰- نگهداری شد. توزین پودر استرپتومایسین جهت تهیه محلول ذخیره براساس روش NCCLS و طبق فرمول زیر انجام می‌شود.

$$\text{Weight(mg)} = \frac{\text{Volume(ml)} \times \text{concentration} (\mu\text{g/ml})}{\text{Assay potency} (\mu\text{g/ml})}$$

در این مطالعه محلول ذخیره آنتی‌بیوتیک با غلظت ۱۰۲۴ تهیه گردید. این محلول تا ۶ ماه پایدار است.

## تهیه محیط‌های کشت:

در این مطالعه از محیط کشت مولر هینتون آگار (Mast England) استفاده شد که پس از استریل کردن در دمای ۵۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد، هموگلوبین به میزان ۱٪ و polyvitex (bio Merieux France) به مقدار ۱٪ اضافه شد سپس از استوک آنتی‌بیوتیک در محیط مولر هینتون برات (سپالمنت شده با polyvitex به میزان ۱٪) رقت‌های مختلف تهیه و به محیط‌های کشت اضافه گردید به طوری که محیط‌های حاصل حاوی آنتی‌بیوتیک در غلظت‌های ۰/۰۲۵ تا ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر شدند. کلیه محیط‌ها پس از حصول اطمینان از نظر آلوده نبودن مورد استفاده قرار گرفتند.

## آماده‌سازی سوسپانسیون میکروبی جهت تلقیح:

از کشت ۴۸ ساعته باکتری در محیط آگار خون ۴ تا ۵ کلنی برداشته و در لوله حاوی ۳ میلی‌لیتر محیط بروسلا برات تلقیح و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند به طوری که پس از انکوباسیون کدورتی معادل ۰/۵ مک‌فارلند (10<sup>8</sup> CFU/ml) داشته باشد.

از سوسپانسیون حاصل در محیط بروسلا آبگوشت رقت 10<sup>-2</sup> تهیه گردید به طوری که سوسپانسیون حاصل حاوی 10<sup>6</sup> CFU/ml باکتری بود. از سوسپانسیون حاصل به میزان ۱۰ میکرولیتر به محیط‌های کشت اضافه شد به طوری که در هر قطره 10<sup>4</sup> CFU/ml باکتری وجود داشت. پلیت‌ها در ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد در مجاورت ۱۰٪ CO<sub>2</sub> به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. به محیط‌های مولر هینتون آگار تکمیل شده بدون آنتی‌بیوتیک نیز باکتری تلقیح

<sup>1</sup> Minimal Inhibitory Concentration<sup>2</sup> Trypticase Soy Broth<sup>3</sup> National Committee for Clinical Laboratory Standards

شد تا هم از رشد و زنده بودن باکتری آگاهی یافته و ضمناً از نظر آلودگی احتمالی نیز کنترل شود. پس از اتمام زمان انکوباسیون پلیت‌ها را از نظر رشد باکتری‌ها بررسی کرده و کمترین غلظتی از آنتی‌بیوتیک که به طور کامل رشد را مهار کرده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

### تعیین MIC سویه‌های بروسلا نسبت به جنتامایسین:

در این تحقیق از محصول جنتامایسین کارخانه Mast انگلستان استفاده شد. براساس دستورالعمل کارخانه سازنده با حل کردن یک قرص در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر غلظتی برابر ۴ μg/ml به دست می‌آید. محیط‌های کشت همانند دستورالعملی که درمورد استرپتومایسین گفته شد تهیه گردید و آنتی‌بیوتیک با غلظت‌های مورد نظر به محیط‌های کشت اضافه شد به طوری که محیط‌های کشت حاوی آنتی‌بیوتیک به میزان ۰/۰۲۵ تا ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر گردیدند.

### تعیین MIC بروسلا نسبت به ریفامپین:

در این تحقیق از پودر ریفامپین (Merck Germany) استفاده شد. مطابق استاندارد NCCLS آنتی‌بیوتیک را وزن کرده و با توجه به این که حلال این آنتی‌بیوتیک متانول و رقیق کننده آب است، استوک ۱۰۲۴ تهیه و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از ساختن محیط کشت و اضافه کردن تکمیل کننده‌ها، از غلظت‌های آنتی‌بیوتیک که در محیط مولر هینتون براث ساپلمنته تهیه شده بود، به محیط‌های کشت اضافه شدند تا محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های آنتی‌بیوتیکی از ۰/۰۲۵ تا ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر شوند. مطابق آنچه قبلاً گفته شد سوسپانسیون باکتری‌ها اضافه و کمترین غلظتی که موجب مهار رشد باکتری شده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

### تعیین MIC بروسلا نسبت به تتراسیکلین،

### نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین:

در این مطالعه از محصول تتراسیکلین، نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین کارخانه Mast

انگلستان استفاده شد. براساس دستورالعمل کارخانه سازنده با حل کردن یک قرص در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر غلظتی برابر با ۱۶ μg/ml برای آنتی‌بیوتیک‌های تتراسیکلین و نورفلوکساسین و غلظت ۸ μg/ml برای آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین به دست می‌آید. از محلول آنتی‌بیوتیک‌های حاصله به محیط‌های کشت که دستور ساخت آن در بخش‌های قبل آمده است اضافه گردید تا محیط‌هایی با غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک (۰/۰۰۲۵-۳۲ μg/ml) به دست آید.

سویه‌های کنترل که در این تحقیق به همراه سویه‌های بروسلا مورد استفاده قرار گرفت عبارت بودند از: ATCC 25922، E.Coli ATCC 29212، Staph. aureus ATCC 9213، Entro. faecalis ATCC 49619، Pneumococcus در مورد انجام آنتی‌بیوگرام و تعیین MIC برای باکتری بروسلا باید بخاطر داشت که دوز عفونت زای این باکتری بسیار کم و همچنین ذرات آئروسول این باکتری می‌تواند از راه دستگاه تنفس و مخاط چشم باعث آلودگی و بیماری انسان شود. لذا تمام مراحل انجام کار در زیر هود بیولوژیک و در هنگام کار از دستکش و ماسک استفاده شد.

### نتایج

۴۷ سویه بروسلا که در این تحقیق بررسی شدند از بیماران مبتلا به بروسلوز جدا شده و همه بروسلا ملی‌تنسین بودند. میزان MIC عوامل ضد میکروبی مطالعه شده با روش رقت در آگار در جدول یک آمده است.

جدول ۱. مقادیر MIC 50 و MIC 90 سویه‌های بروسلا مورد مطالعه

آنتی بیوتیک	دامنه MIC (mg/l)	MIC 50 (mg/l)	MIC 90 (mg/l)
تتراسیکلین	۰/۰۵ - ۰/۰۱	۰/۱۳	۰/۲۵
استرپتومایسین	۰/۰۰۲۵ - ۲	۰/۰۰۳	۰/۲۵
جنتامایسین	۰/۰۰۵ - ۴	۱	۲
ریفامپین	۱ - ۲	۱	۲
سیپروفلوکساسین	۰/۵ - ۴	۰/۷۵	۲
نورفلوکساسین	۲ - ۸	۲	۸

سویه‌های بروسلا نسبت به ریفامپین در نمودار یک آمده است.

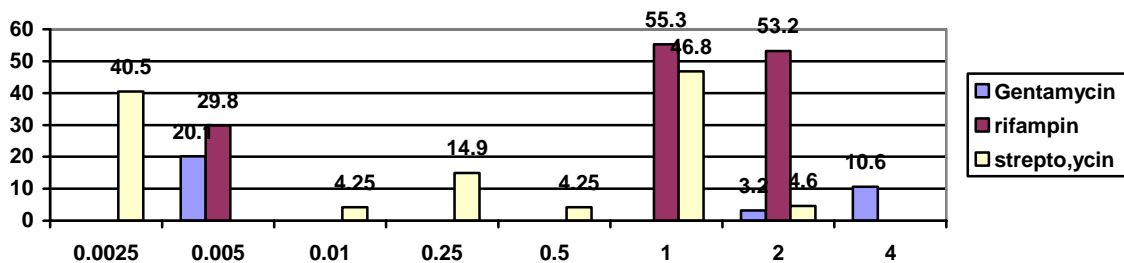
در بین کینولون‌های آزمایش شده، سیپروفلوکساسین دارای طیف MIC ۴-۵ μg/ml بوده که بیش از نیمی (۶۶٪) دارای MIC برابر ۱ بودند. فراوانی نسبی MIC سویه‌های بروسلا نسبت به سیپروفلوکساسین نمودار دو آمده است.

نورفلوکساسین دارای MIC بالاتری بین ۲-۸ μg/ml بود که ۶۳/۸۸٪ دارای MIC برابر ۴ μg/ml بود. فراوانی نسبی MIC سویه‌های بروسلا نسبت به این آنتی‌بیوتیک در نمودار ۲ آمده است.

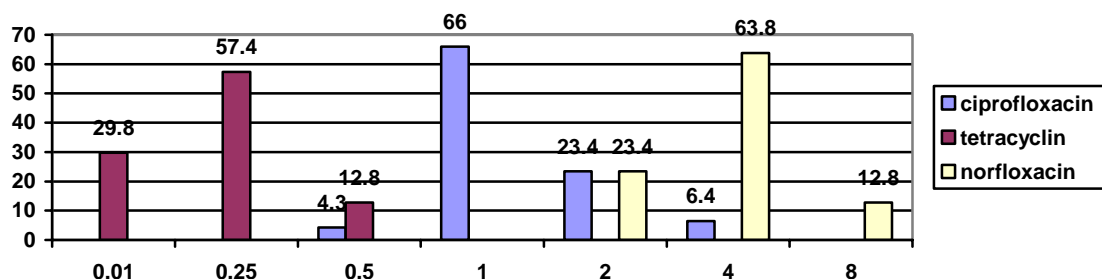
### بحث

افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، عودهای مکرر در بیماری بروسلا، شکست‌های درمانی با روش‌های متداول و فقدان اطلاعات در مورد حساسیت بروسلاها نسبت به داروهای رایج در درمان، ایجاب می‌کند که به بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بروسلاها پرداخته

تتراسیکلین کمترین میزان MIC را در *in vitro* بر علیه بروسلا ملی‌تنسیس داشته است و دامنه آن بین ۰/۱ تا ۵/۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. MIC بیش از نیمی از این باکتری‌ها ۲۵/۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود، ۲۹/۸٪ دارای MIC ۱/۰ و تنها ۱۲/۸٪ MIC برابر ۵/۰ میکروگرم در میلی‌لیتر داشتند. فراوانی MIC سویه‌های بروسلا نسبت به تتراسیکلین در نمودار دو آمده است. در بین آمینوگلیکوزیدها، طیف MIC استرپتومایسین ۲-۲۵۰۰ μg/ml بود. فراوانی نسبی MIC سویه‌های بروسلا نسبت به استرپتومایسین در نمودار یک آمده است. طیف MIC جنتامایسین ۴-۵۰۰۰ μg/ml بوده و فراوانی نسبی سویه‌های بروسلا نسبت به جنتامایسین در نمودار ۱ آمده است. MIC<sub>۹۰</sub> آن به ترتیب ۱ و ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است. MIC سویه‌های بروسلا نسبت به ریفامپین فقط در غلظت‌های ۱ و ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده که ۴۶/۸٪ برابر ۱ و ۵۳/۲٪ دارای MIC برابر ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بودند. فراوانی نسبی MIC



نمودار ۱. فراوانی نسبی سویه‌های بروسلا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، ریفامپین و استرپتومایسین



نمودار ۲. فراوانی نسبی سویه‌های بروسلا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، تتراسیکلین و نورفلوکساسین

شود. در این مطالعه طیف میزان MIC سویه‌های بروسلا نسبت به تتراسیکلین  $0.01-0.5 \mu\text{g/ml}$  بوده که کمترین MIC را دارد (جدول ۱).

در مطالعه فارل<sup>۱</sup> در سال ۱۹۷۶ میزان MIC همه تتراسیکلین‌ها کمتر از  $1 \text{ mg/L}$  گزارش شده است [۱۹]. در مطالعه بوش<sup>۲</sup> و همکاران در سال ۱۹۸۶ نیز میزان MIC  $0.5$  میکروگرم در میلی‌لیتر بوده که مشابه مطالعه حاضر است [۲۰]. در سال ۱۹۸۹ در عربستان سعودی توسط یوسف خان<sup>۳</sup> و همکاران بر روی ۴۹ سویه بروسلا ملی‌تنسیس مطالعه‌ای انجام دادند و میزان MIC را بین  $0.01-0.6$  گزارش کردند [۲۱]. در مطالعه رودریگز<sup>۴</sup> در اسپانیا در سال ۱۹۹۳ میزان MIC  $0.01-2$  میکروگرم در میلی‌لیتر ذکر شده است [۱۲].

در سال ۲۰۰۶ مطالعه‌ای توسط ترکمنی<sup>۵</sup> در ترکیه انجام شده است که میزان MIC نسبت به تتراسیکلین را  $0.032-1.5$  با  $\text{MIC}_{90}$  برابر  $0.5$  میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش نموده است [۲۲]. طیف میزان MIC سویه‌های بروسلا نسبت به تتراسیکلین در مطالعه حاضر مشابه مطالعه رودریگز از اسپانیا در سال ۱۹۹۳ می‌باشد [۱۲] و نسبت به گزارش سال ۲۰۰۶ ترکمنی از کشور ترکیه پایین‌تر می‌باشد. در حالی که از کشور عربستان سعودی مقاومت  $0.6\%$  توسط ممیش<sup>۶</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۰ گزارش شده است [۲۳]. تمام سویه‌های مطالعه حاضر نسبت به تتراسیکلین حساس بودند.

استرپتومایسین نیز در رژیم‌های درمانی یکی از ترکیبات مورد استفاده است. طیف میزان MIC در مطالعه حاضر  $0.025-2$  میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است که نسبت به اکثر مطالعات انجام شده کمتر می‌باشد. میزان  $\text{MIC}_{90}$  در مقایسه با کشورهای همسایه مانند عربستان سعودی (۱۹۸۹) و ترکیه ۲۰۰۶ نیز پایین‌تر بوده است [۲۲، ۲۱]. در حالی که ممیش از

عربستان سعودی در سال ۲۰۰۰ میزان مقاومت نسبت به استرپتومایسین را  $0.6\%$  اعلام کرده است [۲۳]. سویه‌های مطالعه حاضر نسبت به این آنتی‌بیوتیک حساس بودند.

میزان MIC نسبت به جنتامایسین در مطالعه حاضر بین  $0.005$  تا  $4$  میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است. میزان  $\text{MIC}_{50}$  برابر ۱ و  $\text{MIC}_{90}$  برابر ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است که در مقایسه با نتیجه مطالعه سال ۲۰۰۶ ترکمنی یعنی  $0.32$  الی  $1.5$  و  $\text{MIC}_{90}$  برابر ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر همخوانی دارد. ولی در مقایسه با نتیجه  $0.5 \mu\text{g/ml}$  مطالعه داهوک<sup>۷</sup> برابر بالاتر بوده است [۲۴]. این اختلاف احتمالاً به دلیل استفاده بیشتر از جنتامایسین در کشور ما بوده و یا ناشی از اختلاف در تعداد سویه‌های مورد مطالعه است. ریغامپین، یکی از داروهای است که در رژیم درمانی بروسلاز توسط WHO توصیه می‌شود. میزان MIC سویه‌های بروسلا در مطالعه حاضر بین ۲-۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

در مطالعه بوش میزان MIC ریغامپین،  $4 \mu\text{g/ml}$  بوده است [۲۰]. در سال ۱۹۸۹ در مطالعه ای که از عربستان سعودی یوسف خان منتشر کرد، طیف میزان MIC  $0.02-0.5 \mu\text{g/ml}$  بوده است و میزان  $\text{MIC}_{90}$  آن  $0.25$  و  $\text{MIC}_{50}$  برابر  $0.15$  بوده است که این‌ها از مقادیر به دست آمده از مطالعه حاضر کمتر می‌باشد [۲۱]. ولی در مطالعه رابینشتاین<sup>۸</sup> که از اسرائیل در سال ۱۹۹۱ گزارش شده است  $\text{MIC}_{50}$   $2/5$  و  $\text{MIC}_{90}$  برابر ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که از مقادیر مطالعه حاضر بالاتر بوده است [۲۵].

در سال ۲۰۰۴ مطالعه‌ای در مکزیک توسط لوپز<sup>۹</sup> انجام شده که حداکثر میزان MIC، ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده [۱۷] که ۲ برابر حداکثر میزان MIC مطالعه حاضر بوده است ولی میزان  $\text{MIC}_{90}$  آن برابر ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر که با مطالعه حاضر همخوانی داشته است. در مطالعه ترکمنی از ترکیه در سال ۲۰۰۶

<sup>1</sup> Farrel<sup>2</sup> Bosch<sup>3</sup> Yousef Khan<sup>4</sup> Rodriguez<sup>5</sup> Turkmani<sup>6</sup> Memish<sup>7</sup> Dahouk<sup>8</sup> Rubinstein<sup>9</sup> Lopez

طیف میزان MIC، ۱/۵-۰/۰۹۴ و میزان MIC<sub>90</sub> برابر ۱/۰ بوده که از نتایج مطالعه حاضر پایین تر بوده است. حداقل میزان کشندگی (MBC)<sup>۱</sup> ریفامپین برای سویه های بروسلا بین ۱-۰/۰۶ mg/l می باشد [۲۶] و میزان MIC ۲۵ سویه از ۴۷ سویه بررسی شده در این مطالعه برابر ۲ mg/l (نمودار ۱) بوده است. این سویه ها به عنوان غیر حساس در نظر گرفته شدند.

از طرف دیگر براساس NCCLS، باکتری های کند رشد با میزان MIC ۲ میلی گرم در لیتر حساس نسبی در نظر گرفته می شوند [۲۶].

یافته های مطالعه حاضر هشدار برای وقوع مقاومت نسبت به ریفامپین در سویه های بروسلا در کشور به شمار می رود. در نتیجه استفاده از ریفامپین در عفونت های غیرتوبرکولوزیس در مناطقی که انسیدانس بالایی از توبرکولوز وجود دارد باید با احتیاط بیشتری انجام شود و با وجود این محدودیت و رژیم های درمانی متداول بروسلوز می بایستی به دنبال عوامل آنتی میکروبیال جدید بود.

لزوم درمان ترکیبی، طول مدت درمان و نسبت شکست های درمانی با برخی رژیم های دارویی، بررسی و تحقیق در مورد داروهای جدید برای درمان بروسلوز را می طلبد. فلوروکینولون ها طیف فعالیت آنتی باکتریال گسترده ای دارند این داروها به صورت خوراکی بوده و به خوبی در سلول های فاگوسیتی نفوذ کرده و غلظت بافتی بالایی را ایجاد می نمایند و فعالیت خوبی بر علیه سویه های بروسلا در *in vitro* دارند [۲۶].

لذا توجه به استفاده از این داروها در درمان عفونت های ایجاد شده توسط باکتری های داخل سلولی جلب می شود. در این مطالعه بنابر نظر مشاور عفونی از بین فلوروکینولون ها از سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین که فعالیت متوسطی دارند ولی در ایران موجود می باشند، استفاده شده است. طیف میزان MIC سویه های بروسلا نسبت به

سیپروفلوکساسین در مطالعه حاضر ۴-۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر بوده است.

طیف میزان MIC سویه های بروسلا در مطالعه حاضر نسبت به سیپروفلوکساسین نسبت به همه مطالعات بالاتر بوده و تنها در مطالعه یامازهام<sup>۲</sup> از ترکیه در سال ۲۰۰۵ حداکثر میزان MIC ۴ برابر حداکثر میزان MIC در مطالعه حاضر بوده است. در حالی که MIC<sub>90</sub> گزارش از کشور ترکیه از MIC<sub>90</sub> مطالعه حاضر کمتر بوده است [۲۲، ۱۹]. این اختلاف در میزان MIC نسبت به کشورهای دیگر احتمالاً به علت استفاده بی رویه این آنتی بیوتیک در کشور ایران است. در مورد نورفلوکساسین مطالعات کمی صورت گرفته است. میزان MIC سویه های بروسلا مطالعه حاضر نسبت به نورفلوکساسین ۸-۲ میکروگرم در میلی لیتر بوده است. در مطالعه داهوک در سال ۲۰۰۴ میزان MIC ۳ میکروگرم در میلی لیتر بوده است. در سال ۲۰۰۶ از کشور ترکیه گزارشی از ترکمنی و همکاران منتشر شده است و میزان MIC را بین ۰/۲۵ تا ۴ میکروگرم در میلی لیتر گزارش کرده اند. حداکثر میزان MIC در این مطالعه دو برابر حداکثر میزان MIC در دو مطالعه فوق الذکر است [۲۴، ۲۲].

### نتیجه گیری

افزایش مقاومت های آنتی بیوتیکی می تواند یکی از دلایل شکست های درمانی در ایران باشد.

### پیشنهادهای

با وجود اینکه مقاومت آنتی بیوتیکی قابل توجهی در سویه های بروسلا ملی تنسیس در مطالعه حاضر مشاهده نشد موارد زیر توصیه می شود:

۱- انجام آزمایش تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی (آنتی بیوگرام) برای تمام سویه های بروسلا جدا شده از بیماران توصیه نمی شود. ولی در زمان مشاهده عود بیماری انجام تعیین MIC توصیه می گردد.

<sup>2</sup> Yamazham

<sup>1</sup> Minimum Bactericidal Concentration

- ۲- با وجود انسیدانس بالای توبرکولوز در کشور ایران لازم است که ریفامپین را برای درمان توبرکولوز حفظ نمود و در درمان بیماری های دیگر از قبیل بروسلوز به دنبال داروهای جایگزین بود.
- ۳- ارزیابی دوره های جهت تعیین حساسیت سویه ها نسبت به داروهای متداول به خصوص ریفامپین توصیه می گردد.
- ۴- با توجه به نتایج مطالعه حاضر به دلیل MIC پایین تتراسیکلین، استفاده از این دارو در درمان بروسلوز در اولویت قرار می گیرد. همچنین بعلت MIC پائین سیپروفلوکساسین در موارد لزوم به عنوان داروی جایگزین استفاده از این آنتی بیوتیک توصیه می شود.

## منابع

- ۱- دست گلی کامران، منیری رضوان. ترجمه بروسلوز مادکورهم منیر، چاپ اول تهران، چاپ و نشر بنیاد ۱۳۷۱، صفحات ۶-۱۴.
- 2- Rafai M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Vet Microbiol*. 2002; 90: 81-110.
- 3- Pappas G, Papadimitriov P, Akritidis N, Christou L and Tsianos E. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis*. 2006; 6: 91-9.
- 4- World Health Organization. Fact sheet N 173, July 1997. World Health Organization, Geneva Switzerland
- 5- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology*, 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Mosby, 2002, 78-81.
- 6- Doganay M, Aygen B. Human brucellosis an overview. *Int Infect Dis*. 2003; 7: 173-82.
- 7- Solera J, Espinoza A, Martinez- Alfao E. Treatment of Human Brucellosis with Doxycyclosis and Gentamycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41: 80-4.
- 8- Cisneros J, Viciana M P, Colmenero J, Pachon J, Martinez C and Alarcon A. Multicenter prospective study of treatment of *Brucella melitensis* brucellosis with doxycycline plus streptomycin for 2 weeks. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990; 34: 881-3.
- 9- Colmenero J, Hernandez DS, Reguera J M, Cabrera F, Rius F and Alonso A. Comparative trial of doxycycline plus streptomycin versus doxycycline plus rifampin for the therapy of human brucellosis. *Chemotherapy*. 1989; 35: 146-52.
- 10- Kosmidis J, Karagounis A, Tselentis J and Daikos G K. The combination rifampin-doxycycline in brucellosis is better than the WHO regimen. *Chemioterapia* 1982;1(Suppl. 4):107.
- 11- Navarro A, Pachon J, Cuello J A, Viciana P, Lopez L and Carneado J. Brucelosis: estudio prospectivo del tratamiento con tetraciclinas, estreptomicina y sulfadiazina en dos ciclos de tres semanas. *Enf. Infect. Microbiol. Clin*. 1984; 2:274-275.
- 12- Rodriguez M, Gamo A, Moreno J. Evaluacion de dos regimen en el tratamiento de la brucelloses: rifampicin- doxiciclina vs estreptomicina-doxiciclina. *Resultados preliminares*. *N Arch Fac Med*. 1985; 43:171-175.
- 13- Garcia-Rodriguez A J, Munoz Bellido L J, Fresnadillo M J and Trujillano I. In Vitro Activities of New Macrolides and Rifapentine against *Brucella* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1993; Apr, 911-913
- 14- Llorens-Terol J, Busquets RM. Brucellosis treated with rifampin. *Arch Dis Child*. 1980; 55: 486-8.
- 15- Rodriguez, M., L. Buz6n, M. Meseguer, J. Martinez, and E. Bouza. 1980. Rifampin as a single agent in the treatment of acute brucellosis in humans, p. 1064-66. In J. D. Nelson and C. Grassi (ed.), *Current chemotherapy and infectious diseases*, vol.2. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 16- Dimitrove TS., Panigrahi D, Emara M, Awni F, Passadilla R. Seroepidemiological and microbiological study of brucellosis in kuwait. *Med Prince Pract*. 2004; Jul-Aug: 13(4): 215-9.
- 17- Lopez-Merino A., Contreras-Rodriguez A, Migranas-Ortiz R, Orrantia-Gradin R, Hernández-Oliva G M, Gutiérrez-Rubio YT et al. Susceptibility of México in brucella isolates to moxifloxacin,



- ciprofloxacin and other antimicrobials used in the treatment of human brucellosis. Scand J infect Dis. 2004; 36(9):636-8.
- 18- Marianelli C, Ciuchini F, Tarantino M, Pasquali P, Adone R. Genetic bases of the rifampin resistance phenotype in *Brucella* Spp. J Clin microbiol. 2004; 42: 5439-43.
- 19- Farrel ID, Hinchliffe PM, Robertson L. Sensitivity of *brucella* spp. to tetracycline and its analogues. J clin Pathol 1976; 29: 1097-100.
- 20- Bosch J, J Linaros, MJ Lopez de Goicoechea, J Ariza, Cisnal and R. Martin. In vitro activity of ciprofloxacin, ceftriaxone and five other antimicrobial agents against 95 strains of *brucella melitensis*. J Antimicrobial chemotherapy 1986; 17: 459-461.
- 21- Yousef Khan M, Dizon M and Kiel WF. comparative in vitro activities of Ofloxacin, Difloxacin, Ciprofloxacin and other selected antimicrobial agents against *Brucella melitensis*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1989; Aug, p 1409-10.
- 22- Turkmani A, Ioannidis A, Christidou A, Psaroulaki A, Loukaides F and Tselentis Y. In vitro susceptibilities of *Brucella melitensis* isolates to eleven antibiotics. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2006; 5: 24.
- 23- Memish Z, Mah WM, Al Mahmoud S, Al Shaalan M and Yousuf Khan M. *Brucella* Bacteraemia: Clinical and Laboratory Observations in 160 Patients. J infect 2000; 40: 59-63
- 24- Al Dahouk S, Hagen RM, Nockler K, Tomaso H, Witting M, Scholz HC, et al. Failure of a short-term antibiotic therapy for human brucellosis using ciprofloxacin. Chemotherapy 2005; 51(6): 352-6.
- 25- Rubinstein E, Lang R, Shasha B, Hagar B, Diamanstein L, Joseph G, et al. In vitro susceptibility of *Brucella melitensis* to antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 1991; 35: 1925-7.
- 26- Garcia-Rodriguez TA, Garcia Sanchez JE and Trujillano I. Lack of effective bactericidal activity of new quinolones against *Brucella* Sp. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1991; Apr, P: 756-9.